อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความสัมพันธ์ของพลาสมาดีเอ็นเอในระยะต่างๆของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมสตรี

The relationship of plasma DNA level with stages of woman breast cancer

อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน ๕ - ส.ค. ๒๕๕๖
เลขทะเบียน i. 6343053
เลขเรียกหนังสือ ว QP
624
ต3245
2556

1 มิถุนายน 2556

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความสัมพันธ์ของพลาสมาดีเอ็นเอในระยะต่างๆของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมสตรี

The relationship of plasma DNA level with stages of woman breast cancer

อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความร่วมมือจากนิสิตปริญญาโท สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และขอขอบคุณศัลยแพทย์หัวหน้าคลินิกมะเร็งเต้านม หัวหน้ากลุ่มงานศัลยกรรมผู้ป่วยนอก หัวหน้ากลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก นักเทคนิคการแพทย์ประจำหน่วยชีวโมเลกุล โรงพยาบาลพุทธชินราช ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บข้อมูลและผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ทุกท่าน

ขอขอบคุณกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร และ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในโครงการนี้ อีกทั้งบุคคลอื่นที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย

ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ: ความสัมพันธ์ของพลาสมาดีเอ็นเอในระยะต่างๆของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมสตรี

The relationship of plasma DNA level with stages of woman breast cancer

ชื่อผู้วิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร. อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย

หน่วยงานที่สังกัด: ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

หมายเลขโทรศัพท์: 0-5596-6257

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสาขา: เทคนิคการแพทย์

แหล่งทุนที่ได้รับและปีงบประมาณ: กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

งบประมาณรายได้ ปี พ.ศ. 2553

จำนวนเงิน: 150,000 บาท

ระยะเวลาการทำวิจัย ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2554- 30 มิถุนายน 2556

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อภาษาไทย

โรคมะเร็งเป็นภาวะที่เซลล์มีการแบ่งตัวไม่สามารถควบคุมได้ การกลายพันธุ์ของ DNA ภายในเซลล์มีการทำลายข้อมูลของยีนซึ่งเป็นตัวกำหนดหน้าที่ของเซลล์ การเคลื่อนย้ายและการควบคุมความปกติของการแบ่งตัวของเซลล์ มะเร็งเต้านมเป็นเนื้อร้ายในสตรีและเป็นสาเหตุการตายอันดับที่ 1 ของประเทศไทย จากการวิจัยที่ผ่านมา plasma DNA มีปริมาณเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและมีนัยสำคัญเมื่อมะเร็งมีขนาดใหญ่ขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยใช้ EDTA blood สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป วัดปริมาณ plasma DNA ด้วยเครื่องวัดปริมาณชนิดพกพา ศึกษาปริมาณ plasma DNA ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่สัมพันธ์กับภาวะทางคลินิก และผู้ที่มีสุขภาพดี จากการศึกษาพบว่าปริมาณ plasma DNA ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีแนวโน้มสูงกว่าคนสุขภาพดี คนสุขภาพดีมีปริมาณ plasma DNA 0.5 ng/ml ผู้ป่วยมะเร็งทั้งหมดมีปริมาณ plasma DNA 412 ng/ml และผู้ป่วยที่มีขนาดก้อนมะเร็งน้อยกว่า 2 เซนติเมตร เท่ากับ 130 ng/ml และ ผู้ป่วยที่มีขนาดก้อนมะเร็งมากกว่า 2 เซนติเมตร เท่ากับ 782.5 ng/ml มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P-value <0.001 และ 0.001* ตามลำดับ) ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ Plasma DNA ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะต่างๆกับกลุ่มคนสุขภาพดี พบว่า ค่าปริมาณความเข้มข้นของ plasma DNA แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่ระยะที่ 2-4 (*P-value* < 0.001)

ดังนั้น ผู้วิจัยคาดว่า plasma DNA น่าจะสามารถใช้คัดกรองผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเบื้องต้นและสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อทำนายความรุนแรงของมะเร็งเต้านมและเป็นเครื่องมือที่สามารถช่วยแพทย์ติดตามการรักษาได้ในอนาคต

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Cancer is a disease entity characterized by uncontrolled cell proliferation. Breast cancer is the most common malignant disease in woman and the first leading cause of cancer in Thailand. Xiao Yan Zhong et al, reported the levels of DNA in plasma are elevated in malignant breast cancer and correlated with tumor size. At present, the measurements of plasma DNA were easy and low cost. Nucleoospin® plasma XS were used to extract DNA in plasma and then Qubit fluorometer was used to measure plasma DNA concentration. Our result shows that plasma DNA was significantly elevated in breast cancer patients. The clinical pathological factors plasma DNA of tumor size more than 2 cm was higher than tumor size less than 2 cm. The concentrations of plasma DNA in healthy control is 0.5 (0.5 – 26.75) ng/ml and tumor size more than 2 cm patients 782.5 (220 -1,270) ng/ml were higher than tumor size less than 2 cm patients 130 (0.5 - 218) ng/ml. The comparison of plasma DNA between breast cancer patients and healthy group was the breast cancer patients with stage 2-4 were significantly difference (*P*-value < 0.001). This study maybe alternative tool for breast cancer predicts and may help in better management of breast cancer patients.

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัย	1
ขอบเขตของการศึกษาวิจัย	1
2 เนื้อเรื่อง	2
วิธีดำเนินการวิจัย	10
3 ผลการวิจัย	14
4 สรุปและข้อเสนอแนะ	17
บรรณานุกรม	18

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ค่าความเข้นข้นของ plasma DNA แบ่งตามภาวะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม	15
ตารางที่ 2	การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ Plasma DNA ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะต่าง	16

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

มะเร็งเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตและมีค่ารักษาพยาบาลทางการแพทย์สูงในประเทศไทย จาก Hospital-Based Cancer Registry พ.ศ.2551 จำนวนรวมผู้ป่วยในโรงพยาบาล ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึง ธันวาคม พ.ศ.2551 มีจำนวน 34,633 ราย เป็นผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ 2,949 ราย หรือเพิ่มขึ้นประมาณ 8.5 % มะเร็งที่พบบ่อยในผู้ชายเช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ 17.4%, มะเร็งปอด 16.2%, มะเร็งตับและมะเร็งทางเดินน้ำดี 10.5 % มะเร็งที่พบบ่อยในผู้หญิงเช่น มะเร็งเต้านม 43.3 %, มะเร็งปากมดลูก 16.4 %, มะเร็งทางเดินอาหารและลำไส้ใหญ่ 8.8% จากการเพิ่มขึ้นของปัจจัยเสี่ยงมากมายเช่น การมีอายุมากขึ้น, อยู่ในครอบครัวที่มีประวัติของมะเร็งเต้านม, การถ่ายทอดโดยยีน, การมีประจำเดือนที่เร็วเกินไปและการหมดประจำเดือนเมื่อมีอายุมาก, การสูบบุหรี่, การดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์, อาหารและการปนเปื้อนสารเคมีหรือรังสีจากสิ่งแวดล้อม ล้วนแล้วแต่ก่อให้เกิดสารก่อมะเร็ง เครื่องมือที่แพทย์ใช้เพื่อวินิจฉัยในปัจจุบัน เช่น x-ray, Magnetic Resonance Imaging (MRI), Ultrasound, Computed tomography (CT), Positron Emission Tomography (PET), การวิเคราะห์ tumor marker หรือทำ biopsy

Plasma DNA จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นและมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์ในร่างกายมีความเสียหายหรือเกิดอาการอักเสบ ในปัจจุบัน การวิเคราะห์หาปริมาณ Plasma DNA สามารถทำได้ง่ายและราคาไม่แพงสามารถวินิจฉัยภาวะมะเร็งในระยะเริ่มต้นได้ทำให้ Plasma DNA เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถช่วยในการวินิจฉัยมะเร็งในระยะต่างๆได้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อหาความสัมพันธ์ของปริมาณดีเอ็นเอในพลาสมากับระยะของมะเร็งเต้านม

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เพื่อตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอในพลาสมาของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งที่พบมากในประเทศไทย ได้แก่ มะเร็งเต้านม เทียบกับปริมาณดีเอ็นเอในพลาสมาของคนปกติ โดยใช้กลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 200 คน แบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมจำนวน 100 คน จากผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมระยะต่างๆที่มาตรวจรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก และกลุ่มคนปกติที่ไม่ได้เป็นโรคมะเร็งใดๆ จำนวน 100 คน จากคนที่มาตรวจสุขภาพประจำปี ณ หน่วยปฏิบัติการส่งเสริมสุขภาพคณะสหเวช

ศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยใช้ชุดทดสอบสกัดดีเอ็นเอจากพลาสมา และ ทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของ DNA ด้วยเทคนิค fluorometer

บทที่ 2

เนื้อเรื่อง

มะเร็ง

มะเร็ง หมายถึง โรคชนิดหนึ่ง ซึ่งมีลักษณะของการแบ่งเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ และเซลล์เหล่านี้ มีความสามารถที่จะลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่ออื่น ๆ โดยวิธีการใดวิธีการหนึ่ง เช่น เจริญเติบโตโดยตรงเข้าไปในเนื้อเยื่อข้างเคียง (Invasion) หรือการอพยพเคลื่อนย้ายเซลล์ไปยังตำแหน่งที่ไกลๆ (Metastasis) การเจริญเติบโตแบบไม่เป็นระเบียบของเซลล์นี้ อาจมีสาเหตุ ที่เกิดขึ้นภายหลัง หรือเป็นกรรมพันธุ์ โดยการกลายพันธุ์ของ DNA ภายในเซลล์ มีการทำลายข้อมูลของยีน ซึ่งเป็นตัวกำหนดหน้าที่ของเซลล์ การเคลื่อนย้าย และการควบคุมความปกติของการแบ่งตัวของเซลล์

กลไกการควบคุมการแบ่งเซลล์

การที่เซลล์มะเร็งแบ่งเซลล์ไปได้เรื่อย ๆ โดยไม่สามารถควบคุมได้ แสดงว่ากลไก การควบคุมการแบ่งเซลล์มีความผิดปกติ โดยปกติยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. **ยีนที่ทำ**งานโดยการยับยั้งการแบ่งเซลล์ (Tumor Suppressor Gene) ยีนกลุ่มนี้มีลักษณะการทำงานที่สำคัญ คือ เมื่อยีนทำงาน เซลล์จะหยุดการแบ่งตัว ยีนจะหยุดการแสดงออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ และเมื่อใดก็ตาม ที่ยีนกลุ่มนี้สูญเสียหน้าที่ ไม่สามารถแสดงออกได้ เซลล์จะแบ่งตัวโดยไม่มีที่สิ้นสุด

2. **ยีนที่ทำ**งานโดยการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (Proto Oncogene) ยีนกลุ่มนี้มีลักษณะการทำงานที่ตรงกันข้ามกับ Tumor Suppressor Gene กล่าวคือ ยีนจะแสดงออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ เมื่อใดก็ตามที่ยีนหยุดการแสดงออก เซลล์จะหยุดการแบ่งตัว ดังนั้นการเกิดการกลายพันธุ์ จนยีนแสดงออกมาตลอดเวลา เซลล์จะแบ่งตัว โดยไม่มีที่สิ้นสุด ยีนกลุ่มแรก ๆ ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับมะเร็ง คือ Oncogene ยีนนี้ พบครั้งแรกในไวรัสก่อมะเร็ง ตัวอย่างเช่น Rous Sarcoma Virus (RSV) ซึ่งเป็น RNA Virus เมื่อเข้าไปในเซลล์แล้ว จะใช้เอนไซม์สร้าง DNA ขึ้นจาก DNA ของตนเอง DNA นี้ เรียกว่า Provirus สามารถแทรกตัว เข้ากับ DNA ของเซลล์ แล้วทำให้เซลล์เป็นเซลล์มะเร็งได้ (วิภาภรณ์, 2550)

เหตุส่งเสริมของมะเร็งที่ทำให้เซลล์ทำงานผิดปกติ

1. เหตุส่งเสริมที่อยู่ภายนอกร่างกาย

(1) สารกายภาพต่าง ๆ (Physical Agents) ส่วนใหญ่เกิดจากการระคายเรื้อรัง

เช่น ฟันปลอมที่ไม่กระชับ เวลาเคี้ยวอาหาร จะมีการเสียดสีกับเหงือกหรือเพดานปาก อาจจะท าให้เกิดมะเร็งของเหงือกหรือเพดานปากได้ การกระทบกระแทก การคลอดบุตรหลายๆ คน หรือการมีกระบังลมหย่อนในหญิงสูงอายุ ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูกได้ง่าย รังสีต่างๆ เป็นต้น

(2) สารเคมี (Chemical Agents)

(3) ฮอร์โมน (Hormone)

(4) เชื้อไวรัส มีไวรัสหลายชนิด เป็นสาเหตุทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้ เมื่อไวรัสเข้าไปในเซลล์แล้ว ก็จะมีการเพิ่มจำนวน (Productive Infection) หรือทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงในรูปร่างไปได้ (Transformation)

(5) สารพิษ (Toxin)

(6) พยาธิบางชนิด เช่น พยาธิใบไม้ในตับ

(7) ภาวะขาดอาหาร

2. เหตุส่งเสริมภายในร่างกาย

(1) เชื้อชาติ มะเร็งบางชนิด จะพบมากในเฉพาะบางเชื้อชาติ เช่น มะเร็งโพรงหลังจมูก พบมากในชาวจีน เป็นต้น

(2) เพศ มะเร็งบางชนิดพบมากในเพศชาย เช่น มะเร็งปอด มะเร็งตับ แต่มะเร็งบางชนิด พบมากในเพศหญิง เช่น มะเร็งเต้านม

(3) อายุ มะเร็งบางชนิดพบมากในคนอายุน้อย เช่น มะเร็งของเนื้อเยื่อที่เรียกว่า Sarcoma ในขณะที่มะเร็งของเยื่อบุที่เรียกว่า Carcinoma จะพบมากในคนอายุมาก และมะเร็งบางชนิดจะพบเฉพาะในเด็กเท่านั้น เช่น มะเร็งของลูกตาชนิดเรติโนบลาสโตมา(Retinoblastoma)

(4) กรรมพันธุ์ (Genetics)

(5) ความผิดปกติต่างๆ เช่น ในกรณีที่เป็นไฝ หรือปานดำ มีโอกาสจะกลายเป็นมะเร็งผิวหนัง เมลาโนมาชนิดร้าย (Malignant Melanoma)

ชนิดและการดำเนินโรคของมะเร็งชนิดแบ่งตามกลุ่ม

1. กลุ่ม Carcinoma หมายถึง มะเร็งซึ่งมาจากเซลล์เยื่อบุผิวของอวัยวะทั้งภายในและภายนอกร่างกาย ซึ่งเซลล์เยื่อบุผิวของร่างกายมี 4 ชนิดใหญ่ได้แก่

   (1) Glandular คือ กลุ่มของเซลล์เยื่อบุผิวที่สร้างสารคัดหลั่ง

   (2) Squamous คือ กลุ่มของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีลักษณะแบนบางหลายเหลี่ยม

   (3) Transitional คือ เซลล์เยื่อบุผิวที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ตามการขยายและหดตัวของอวัยวะนั้นๆ จะพบในอวัยวะ เช่น ท่อทางเดินปัสสาวะ

   (4) Pseudostratified คือ เซลล์เยื่อบุผิวที่เรียงตัวหลายชั้นเทียม จะพบในอวัยวะ เช่น ปอด มะเร็งสามารถเกิดขึ้นได้จากเซลล์เยื่อบุอวัยวะชนิดต่างๆเหล่านี้ ตัวอย่างเช่น มะเร็งเต้านม

(Breast Carcinoma) ส่วนใหญ่เกิดจากเซลล์เยื่อบุของต่อมสร้างน้ำนม

2. กลุ่ม Sarcoma หมายถึง มะเร็งที่เกิดจากเนื้อเยื่ออ่อน(Soft Tissue) ของร่างกาย หรือเนื้อเยื่อเสริม (Supportive Tissue) ซึ่งได้แก่ ไขมัน กล้ามเนื้อ เส้นประสาท และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน นอกจากนี้ ยังรวมถึงกระดูกและกระดูกอ่อนด้วย
3. กลุ่ม Lymphoma หมายถึง มะเร็งที่พัฒนามาจากต่อมน้ำเหลือง และเนื้อเยื่อของระบบภูมิต้านทาน
4. กลุ่ม Leukemias หมายถึง มะเร็งของระบบโลหิต เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่อยู่ในไขกระดูก (Bone Marrow)
5. กลุ่ม Melanoma หมายถึง มะเร็งที่มาจากเซลล์ผลิตเม็ดสี (Melanocytes) ซึ่งจะพบตามผิวหนัง ไฝ (Mole) คือการเจริญเติบโต ของเซลล์เม็ดสีประเภทไม่เป็นอันตราย

ชนิดของมะเร็งแบ่งตามอวัยวะที่เกิด

1. **มะเร็งปากม**ดลูก เป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดในหญิงไทยพบมากใน ช่วงอายุ 35 - 50 ปี และสามารถป้องกันได้
2. **มะเร็งเต้านม** เป็นมะเร็งที่พบบ่อยในหญิงไทยเป็นที่สองรองจากมะเร็งปากมดลูก มักเกิดในหญิงอายุ 40 ปีขึ้นไป และพบมากในหญิงที่ไม่มีบุตรหรือมีบุตรน้อย และในผู้ที่มีประวัติญาติพี่น้องเคยเป็นมะเร็งเต้านมหญิงอายุน้อยหรือชายก็อาจเป็นมะเร็งเต้านมได้ แต่พบได้น้อย
3. **มะเร็งตับ** เป็นมะเร็งที่มีการด าเนินโรคเร็วมาก มักจะเสียชีวิตใน 3 -6 เดือน
4. **มะเร็งปอด** เป็นโรคที่พบมากและเป็นสาเหตุการตาย ในอันดับต้นในประเทศไทย ส่วนใหญ่เกิดจากการสูบบุหรี่
5. **มะเร็งช่องป**าก หมายถึง มะเร็งของริมฝีปาก ลิ้น กระพุ้งแก้ม เหงือก พื้นปาก และเพดาแข็ง
6. **มะเร็งหลังโ**พรงจมูก พบบ่อยในคนเชื้อชาติจีน พบในเพศชาย มากกว่าหญิง
7. **มะเร็งกล่อง**เสียง เป็นมะเร็งที่พบบ่อยในผู้สูงอายุ โดยเฉลี่ยอายุประมาณ 60-70 ปี
8. **มะเร็งต่อมธ**ัยรอยด์ เป็นมะเร็งที่พบบ่อยในเด็กและในผู้หญิงอายุ 30-40 ปี
9. **มะเร็งของถุงน้ าดี** พบได้น้อยกว่ามะเร็งท่อน้ าดี และพบในผู้มีอายุ 40 ปีขึ้นไป และพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ส่วนมะเร็งท่อน้ าดีพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง
10. **มะเร็งตับอ่อน** เป็นมะเร็งที่พบได้ไม่บ่อยนัก แต่เนื่องจากตับอ่อนเป็นอวัยวะ ที่อยู่หลังเยื่อบุช่องท้อง การตรวจวินิจฉัยค่อนข้างยาก และอาการจะปรากฏเมื่อมะเร็งมักจะลุกลามมากแล้ว
11. **มะเร็งรังไข่** เป็นมะเร็งที่พบได้มากเป็นอันดับ 2 ของมะเร็งระบบอวัยวะสืบพันธุ์สตรี พบ ได้มากในช่วงอายุ 40-60 ปีในเด็กก่อนหรือหลังวัย 10 ปีก็อาจพบได้
12. **มะเร็งมดลูก** พบได้น้อยกว่ามะเร็งปากมดลูก ในสตรีที่อายุ 40-60 ปี มักพบใน ภายหลังหมดประจำเดือนแล้ว
13. **มะเร็งกระดูก** เป็นมะเร็งที่พบได้น้อย มักพบในผู้ที่มีอายุมากกว่า 40 ปี และพบใน เพศชาย

มากกว่าเพศหญิง

14. **มะเร็งผิวหนัง** เป็นมะเร็งที่พบได้น้อย ประมาณร้อยละ 5 ของมะเร็งทั้งหมด มักพบในผู้ที่มีอายุมากกว่า 40 ปี และพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง
15. **มะเร็งต่อมลูกหมาก** ต่อมลูกหมาก เป็นอวัยวะส่วนหนึ่งของระบบสืบพันธุ์เพศชาย มีลักษณะคล้ายผลลิ้นจี่ ทำหน้าที่ในการผลิตของเหลวเพื่อหล่อลื่นและนำส่งเชื้ออสุจิ ในขณะที่มีการหลั่งน้ำอสุจิออกมา
16. **มะเร็งเม็ดเลือดขาว** เป็นโรคมะเร็งชนิดหนึ่งของระบบเลือดที่เกิดจากการที่เซลล์เม็ดเลือดขาวในไขกระดูกเติบโตผิดปกติ ทำให้มีการสร้างเม็ดเลือดขาวออกมามากในกระแสเลือด ทำให้การทำงานของระบบเม็ดเลือดเสียไป อาจเป็นแบบเฉียบพลัน (Acute leukemia) หรือเป็นแบบช้า ๆ ค่อยๆเป็น (Chronic leukemia) โดยทั่วไปมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันจะมีอาการรุนแรงกว่าชนิดที่เกิดช้า ๆ หรือเรื้อรัง
17. **มะเร็งต่อมน้ำเหลือง** เป็นมะเร็งที่เกิดจากเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ เพิ่มจำนวน และเจริญเติบโตผิดปกติ ทำให้ต่อมน้ำเหลืองโตเร็วมาก มักพบบริเวณต่อมน้ำเหลืองที่คอ รักแร้ และขาหนีบ ซึ่งหากไม่ได้ รับการรักษาแต่ต้นแล้ว มะเร็งจะกระจายไปสู่ระบบต่างๆ ของร่างกาย และทำให้การทำงานของร่างกาย ล้มเหลวถึงแก่ชีวิตได้
18. **มะเร็งและเนื้องอกในระบบประสาท** สาเหตุของเนื้องอกระบบประสาท ทั้งในผู้ใหญ่และเด็ก ยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด แต่พบว่ามีการเจริญแบ่งตัวรวดเร็วผิดปกติของเซลล์อื่น ๆ ในระบบประสาท เช่น เนื้องอกจากเซลล์ประสาท เนื้องอกจากเยื่อหุ้มสมองและไขสันหลัง เนื้องอกจากต่อมต่าง ๆ ในสมอง เนื้องอกจากเซลล์ปลอกประสาท เป็นต้น
19. **มะเร็งทาง**เดินปัสสาวะ และอวัยวะสืบพันธุ์ชาย สาเหตุที่แท้จริงของมะเร็งยังไม่ทราบแน่ชัด มะเร็งที่พบบ่อย ได้แก่ มะเร็งของกระเพาะปัสสาวะ ต่อมลูกหมาก ไต อวัยวะเพศชาย ลูกอัณฑะ และท่อไต

การแพร่กระจายของมะเร็ง

1. **โดยทางกระแสเลือด** เซลล์มะเร็งจะหลุดเข้ากระแสเลือด แล้วไปเจริญเติบโตในอวัยวะต่างๆ เช่น ปอด ตับ กระดูก สมองเป็นต้น
2. **โดยทางกระแสน้ำเหลือง** เซลล์มะเร็งหลุดเข้าหลอดน้ำเหลืองแล้วไปเจริญเติบโตในต่อมน้ำเหลือง บริเวณใกล้เคียง ทำให้ต่อมน้ำเหลืองมีขนาดโตได้มาก ๆ จากต่อมน้ำเหลืองนี้เองเซลล์มะเร็งอาจจะแพร่กระจาย เข้าสู่หลอดเลือดอีกทอดหนึ่งได้
3. **โดยการฝังตัวของเซลล์มะเร็ง (Implantation)** โดยเซลล์มะเร็งหลุดจากตำแหน่งเดิม ไปเจริญที่ส่วนอื่น อาจจะเป็นการหลุดโดยธรรมชาติ หรือโดยมีการกระตุ้น เช่น จากการผ่าตัด เป็นต้น

4. โดยการไปจับหรือรวมตัวตามพื้นผิวของผนังเยื่อบุ (Transcoelomic) โดยเซลล์มะเร็งหลุดจากก้อนมะเร็งไปงอกตามพื้นผิวของเยื่อบุต่าง ๆ เช่น ตามพื้นผิวของเยื่อบุช่องท้อง ช่องปอด เป็นต้น(ไพรัช, 2528)

มะเร็งเต้านม

มะเร็งเต้านมเป็นเนื้องอกร้ายเกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อของเต้านม เนื้อร้ายจะเริ่มมีปริมาณมากขึ้นที่เนื้อเยื่อของเต้านม เมื่อไม่ได้รับการรักษา มะเร็งสามารถกระจายออกสู่ร่างกายได้อย่างรวดเร็ว มะเร็งเต้านมสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งผู้หญิงและผู้ชายแต่ในผู้ชายจะมีความถี่ในการเป็นมะเร็งเต้านมน้อยกว่าผู้หญิง มะเร็งเต้านมเริ่มเกิดขึ้นบริเวณต่อมน้ำนมหรือบริเวณท่อน้ำนมหรือต่อมน้ำเหลืองที่อยู่บริเวณเต้านม

ปัจจัยเสี่ยง

ผู้หญิงที่มีมารดาหรือพี่น้องที่เป็นมะเร็งเต้านมจะมีความเสี่ยงสูงประมาณ 2 ถึง 3 เท่าของผู้หญิงทั่วไป, ผู้หญิงที่มีประวัติการเป็นมะเร็งเต้านมอยู่ 1 ข้างมีโอกาสสูงที่จะเป็นมะเร็งได้อีกข้าง, การใช้ฮอร์โมนเช่นยาเม็ดคุมกำเนิด, การมีประจำเดือนเร็วหรือการหมดประจำเดือนเมื่ออายุมากหรือการมีภาวะอ้วนจะเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งเต้านมได้ถึง 50 %

ระยะของมะเร็งเต้านม

The American Joint Committee ได้แบ่งระยะของมะเร็งเต้านมไว้ 7 ระยะ ดังนี้

ระยะ 0 : มะเร็งอยู่บริเวณเกิดและเนื้อเยื่อบริเวณนั้นยังปกติ

ระยะ I : ก้อนมะเร็งมีเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 2 ซ.ม.และยังไม่กระจายออกไปบริเวณอื่น

ระยะ IIA : ก้อนมะเร็งมีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 2 ซ.ม.แต่ไม่เกิน 5 ซ.ม.และยังไม่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้ หรือ ก้อนมะเร็งมีขนาด 2 ซ.ม.และมีการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้

ระยะ IIB : ก้อนมะเร็งมีขนาด 5 ซ.ม. และไม่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้ หรือก้อนมะเร็งมีขนาด 2 ซ.ม.และมีการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้

ระยะ IIIA : ก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กกว่า 5 ซ.ม. แต่มีการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้หรือต่อมอื่นๆ หรือ ก้อนมะเร็งมีขนาดมากกว่า 5 ซ.ม. และกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้

ระยะ IIIB : ก้อนมะเร็งกระจายไปทั่วเนื้อเยื่อเต้านม หรือบริเวณหน้าอก หรือมะเร็งกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณหน้าอกขนานไปกับกระดูก sternum

ระยะ IV : ก้อนมะเร็งมีหลายขนาดกระจายไปทั่วเต้านม มีการกระจายไปทั่วหน้าอก,

ปอด กระดูก หรือตับ

การวินิจฉัยมะเร็งเต้านม

1. Mammography and Full-field digital mammography (FFDM)

การตรวจเอกซเรย์เต้านมเป็นเทคนิคการตรวจทั่วไปที่แพทย์นิยมใช้เมื่อพบว่ามีปัญหาเกี่ยวกับเต้านมในการคัดกรองและวินิจฉัยรวมถึงการตรวจสุขภาพประจำปี ข้อดีของการวินิจฉัยนี้คือสามารถแยกแยะเนื้อเยื่อปกติออกจากเนื้อเยื่อร้ายได้ การตรวจวิธีนี้จะใช้รังสี x-ray ทำการสร้างภาพของเต้านมไปบนแผ่นฟิล์ม และภาพสามารถบันทึก, ดูและเก็บรักษาไว้ในระบบคอมพิวเตอร์ได้

2. Breast ultrasound or sonography

การตรวจวิธีนี้ใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงร่างภาพส่วนของร่างกายอย่างคร่าวๆ คลื่นเสียถูกส่งไปที่พื้นที่เป้าหมายแล้วสะท้อนกลับมารับอุปกรณ์รับคลื่นเสียงแล้วสร้างภาพโดยการแปลจากการสะท้อนกลับของคลื่นเสียงโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เทคนิคนี้เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในการวินิจฉัยเมื่อใช้ร่วมกับการตรวจเอกซเรย์เนื่องจากสามารถวินิจฉัยได้ทั่วไปและมีราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับการวินิจฉัยด้วยวิธีอื่นๆ

3. Magnetic resonance imaging (MRI)

MRI เป็นการตรวจที่พัฒนาขึ้นโดยใช้คลื่นวิทยุ สนามแม่เหล็กขนาดสูง สามารถสร้างภาพส่วนของร่างกายที่มีความแตกต่างของความเข้ม โดยที่มะเร็งสามารถดูดกลืนคลื่นวิทยุได้สูงกว่า สามารถแสดงให้เห็นถึงขนาดและรูปแบบของเนื้อเยื่อที่ผิดปกติได้

4. การตรวจชิ้นเนื้อ

สารพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอ (DNA)

DNA หรือสารพันธุกรรม (deoxy-ribonucleic acid; DNA) เป็นกรดนิวคลิอิก (Nucleic acid) ที่ทำหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต DNA ส่วนใหญ่อยู่ในรูปโครโมโซม (chromosome) วางตัวอยู่ในส่วนนิวเคลียสภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต DNA มีหน้าที่สำคัญ 2 ประการ คือ

1. **การจำลองตัวเอง (DNA replication)** DNA ของสิ่งมีชีวิตมีความสามารถสร้างและจำลองตัวเอง ขณะเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์ เพื่อสร้าง DNA ที่เหมือนเดิมทุกประการให้แก่เซลล์ใหม่
2. **การถ่ายทอดข้อมูลผ่านอาร์เอ็นเอ (transcription)** DNA สามารถถูกถอดรหัสเพื่อสร้างเป็นอาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid; RNA) RNA ที่ได้นี้ทำหน้าที่กำหนดการเรียงตัวของกรดอะมิโนในกระบวน การสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งโปรตีนจะถูกนำมาเป็นส่วนประกอบสำคัญในโครงสร้างขององค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ และเป็นสารเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีหรือเอนไซม์ (enzyme) ในสิ่งมีชีวิต

สำนักหอสมุด
ว. 6343053
๕ - ส.ค. ๒๕๕๖

ด้วยหน้าที่ทั้ง 2 ประการของ DNA ทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถสืบทอดลักษณะประจำพันธุ์ และดำรงเผ่าพันธุ์อยู่ได้ สารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง เช่น ในพืช สัตว์ และมนุษย์ อยู่ในรูปของโครโมโซม ประกอบด้วยส่วนที่เป็น DNA และโปรตีนประเภทฮิสโทน (histone) ที่เข้าเกาะกัน และทำการพันเกลียวเพิ่มขนาดขึ้นจนเป็นโครโมโซมภายในนิวเคลียสของเซลล์ โครโมโซมมีความสามารถในการถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่ไปยังรุ่นลูกได้ โดยที่ลูกจะได้รับโครโมโซมชุดหนึ่งจากพ่อและอีกชุดหนึ่งจากแม่ ลูกจึงมีลักษณะต่างๆ ที่เหมือนกับพ่อและ/หรือแม่ หากมีการกลายพันธุ์ของ DNA ภายในเซลล์ หรือมีการการท าลายข้อมูลของยีน จะส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต และการแบ่งตัวที่ผิดปกติ (อภิชาติ, 2547)

การตรวจ DNA

DNA เป็นสารเคมีที่พบในนิวเคลียสของเซลล์เป็นตัวสร้างโครโมโซมซึ่งเป็นส่วนสำคัญของเซลล์และอวัยวะต่างๆ

1. DNA ตอบสนองต่อการส่งผ่านของข้อมูลไปยังเซลล์ใหม่ขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัว
2. DNA ตอบสนองต่อการส่งผ่านของข้อมูลจากรุ่นสู่รุ่นในขณะที่มีการขยายเผ่าพันธุ์
3. DNA สร้างโปรตีนหลักที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่การทำงานของเซลล์

ปัจจัยที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงไปของ DNA เช่น รังสี, แสงอัลตราไวโอเล็ต สารเคมี ไวรัส หรือจากสภาพแวดล้อม ในภาวะที่ DNA มีความเสียหายอย่างรุนแรงทำให้ DNA ปล่อยสารเคมีออกจาก DNA สู่สารละลายรอบๆ โมเลกุล ทำให้สามารถวัดปริมาณการปล่อยสารเคมีดังกล่าวในเชิงปริมาณได้

ปัจจัยเสี่ยงผู้หญิงที่มีมารดาหรือพี่น้องที่เป็นมะเร็งเต้านมจะมีความเสี่ยงสูงประมาณ 2 ถึง 3 เท่าของผู้หญิงทั่วไป, ผู้หญิงที่มีประวัติการเป็นมะเร็งเต้านมอยู่ 1 ข้างมีโอกาสสูงที่จะเป็นมะเร็งได้อีกข้าง การใช้ฮอร์โมนเช่นยาเม็ดคุมกำเนิด การมีประจำเดือนเร็วหรือการหมดประจำเดือนเมื่ออายุมาก หรือการมีภาวะอ้วนจะเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งเต้านมได้ถึง 50 %

การแบ่งเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ของเซลล์มะเร็งเหล่านี้ มีความสามารถที่จะลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่ออื่น ๆ โดยวิธีการใดวิธีการหนึ่ง เช่น เจริญเติบโตโดยตรงเข้าไปในเนื้อเยื่อข้างเคียง (Invasion) หรือการอพยพเคลื่อนย้ายเซลล์ ไปยังตำแหน่งที่ไกลๆ (Metastasis) การเจริญเติบโตแบบไม่เป็นระเบียบของเซลล์นี้ อาจมีสาเหตุที่เกิดขึ้นภายหลัง หรือเป็นกรรมพันธุ์ โดยการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอภายในเซลล์ มีการทำลายข้อมูลของยีน ซึ่งเป็นตัวกำหนดหน้าที่ของเซลล์ การเคลื่อนย้าย และการควบคุมความปกติของการแบ่งตัวของเซลล์ การแพร่กระจายของมะเร็ง โดยทางกระแสเลือด เซลล์มะเร็งจะหลุดเข้ากระแสเลือด แล้วไปเจริญเติบโตในอวัยวะต่างๆ เช่น ปอด ตับ

กระดูก สมองเป็นต้น โดยทางกระแสน้ำเหลือง เซลล์มะเร็งหลุดเข้าหลอดน้ำเหลืองแล้วไปเจริญเติบโตในต่อมน้ำเหลือง บริเวณใกล้เคียง ทำให้ต่อมน้ำเหลืองมีขนาดโตได้มาก ๆ จากต่อมน้ำเหลืองนี้เองเซลล์มะเร็งอาจจะแพร่กระจาย เข้าสู่หลอดเลือดอีกทอดหนึ่งได้ โดยการฝังตัวของเซลล์มะเร็ง โดยเซลล์มะเร็งหลุดจากตำแหน่งเดิม ไปเจริญที่ส่วนอื่น อาจจะเป็นการหลุดโดยธรรมชาติ หรือโดยมีการกระตุ้น เช่น จากการผ่าตัด เป็นต้น โดยการไปจับหรือรวมตัวตามพื้นผิวของผนังเยื่อบุ โดยเซลล์มะเร็งหลุดจากก้อนมะเร็งไปงอกตามพื้นผิวของเยื่อบุต่าง ๆ เช่น ตามพื้นผิวของเยื่อบุช่องท้อง ช่องปอด

จากรายงานการศึกษาดีเอ็นเอในพลาสม่าของผู้ป่วยมะเร็ง พบว่าผู้ป่วยมะเร็งมีระดับดีเอ็นเอใน พลาสม่า สูงกว่าในกลุ่มตัวอย่างที่มีสุขภาพแข็งแรง มีข้อมูลรายงานว่า DNA Fragments ในพลาสมาได้มาจากเซลล์มะเร็ง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยที่สูงกว่าระดับที่มีในพลาสมาของคนปกติ (Gormally, 2004) ค่าเฉลี่ยของระดับดีเอ็นเอในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งที่ทำการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์มีค่าที่หลากหลายและอยู่ในช่วงที่ห่างกันตั้งแต่10-1000 ng/ml และระดับของพลาสมาดีเอ็นเอไม่สัมพันธ์กับชนิดของมะเร็ง (Jahr et al,2001) ส่วน Gautschi et al ได้ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอในพลาสมาโดยวิธี real time PCR ของผู้ป่วยมะเร็งปอด พบว่ามีค่าสูงกว่าคนปกติ และมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค เช่นเดียวกับผู้ป่วยมะเร็งเต้านม พบว่ามีประมาณ DNA สูงในพลาสมา ซึ่งมีความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็งอีกด้วย (Silva et al, 2002)

ดังนั้นการศึกษาระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม เนื่องจากเป็นมะเร็งที่พบได้ในอัตราที่สูงในคนไทย เพื่อสามารถพัฒนานำวิธีการตรวจนี้ใช้ประโยชน์ในการตรวจติดตาม วินิจฉัย และรักษาผู้ที่เป็นโรคมะเร็งได้

วิธีดำเนินงานวิจัย

1 รูปแบบการวิจัย (Study design)

ประเภทวิจัยประยุกต์ (Applied research)

2 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย (Sample)

กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและกลุ่มผู้ที่ไม่มีภาวะมะเร็ง ประกอบด้วย

- ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะต่างๆ 100 ราย
- ผู้ที่ไม่มีภาวะมะเร็งเต้านม 100 ราย

เกณฑ์คัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง

- กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านม
  - ผู้ป่วยที่เข้ามารักษาที่ โรงพยาบาลพุทธชินราช จ.พิษณุโลก
  - ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ที่ระบุว่ามีภาวะมะเร็งเต้าน
  - ไม่มีภาวะอักเสบ (WBC น้อยกว่า 10,000 cells/cumm)

- กลุ่มผู้ที่ไม่มีภาวะมะเร็ง
  - อาสาสมัครที่เข้ามาตรวจสุขภาพมีผลการตรวจสุขภาพปกติ
  - ไม่มีประวัติการเป็นมะร็ง

การเก็บตัวอย่าง

เจาะเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งและผู้ที่ไม่มีภาวะมะเร็ง 4 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA 2 หลอด นำไปปั่นแยก plasma ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย centrifuge จำนวน 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 800 g เป็นเวลา 10 นาที และ 1,600 g เป็นเวลา 10 นาที ภายใน 2 ชั่วโมงหลังเจาะ

4 เครื่องมือในการวิจัย (Research Instrument/Material)

(1) ชุดทดสอบ Nucleospin ® Plasma XS (Macherey-Nagel, Germany)

(2) เครื่อง Qubit fluorometer (Gibthai, Thailand)

5 ขั้นตอน และวิธีการเก็บรวมรวมข้อมูล (Data Collection/Method)

1. ซักประวัติกลุ่มประชากรตัวอย่าง

2. นำพลาสมาของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยจำนวนทั้งหมด 200 คน ทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดทดสอบ Nucleospin ® Plasma XS โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1 ขั้นตอนการเตรียมพลาสมา

(1) นำพลาสมามาละลาย

(2) นำไปปั่นที่ ความเร็ว 11,000 x g (13,000 rpm) เป็นเวลา 3 นาที

2.2 ขั้นตอนการเตรียม sample

(1) ดูดพลาสมาปริมาตร 240 µl ใส่ใน Micro-centrifuge tube ขนาด 1.5 ml

(2) เติม Proteinase K ปริมาตร 20 µl

(3) ทำการ Mix และ Incubate ที่ 37 °c เป็นเวลา 10 นาที

2.3 ขั้นตอน Adjust DNA binding conditions

(1) เติม Binding buffer (BB) ปริมาตร 360 µl ลงไปใน tube ข้อ 2.2 จากนั้น Invert tube 3 ครั้ง

(2) Vortex 3 วินาที แล้วน าไป Spin down

2.4 ขั้นตอน Bind DNA

(1) ดูดส่วนผสมในข้อ 2.3 มาปริมาตร 600 µl ใส่ในชุดทดสอบ NucleoSpin® Plasma XS column

(2) นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 x g (5,500 rpm) เป็นเวลา 30 วินาที และปั่นต่อที่ความเร็ว 11,000 x g (13,000 rpm) เป็นเวลา 5 วินาที

2.5 ขั้นตอน Wash and dry silica membrane

(1) ครั้งที่ 1 ทิ้ง collecting tube อันเดิมแล้วใส่ column ลงใน collecting tube อันใหม่

(2) เติม wash buffer (WB) ปริมาตร 500 µl ลงไปใน column แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที

(3) ครั้งที่ 2 ทำเหมือนครั้งที่ 1 แต่เปลี่ยนปริมาตรของ WB จาก 500 µl เป็น 250 µl แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 3 นาที

2.6 ขั้นตอน Elute DNA

(1) ทิ้ง Collecting tube อันเดิม แล้วใส่ column ลงใน Micro-centrifuge อันใหม่

(2) เติม Elution Buffer ปริมาตร 30 µl แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที

2.7 ขั้นตอน Removal of residual ethanol

(1) ทิ้งส่วน column แล้วนำส่วนที่เป็น Micro-centrifuge จากข้อ 2.6 มา Incubate ที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 17 นาที โดยไม่ต้องปิดฝาจะได้ DNA ออกมา

3. นำ DNA ที่สกัดได้จากชุดทดสอบ Nucleospin ® Plasma XS มาตรวจวัดหาปริมาณความเข้มข้นด้วยเครื่อง Qubit® fluorometer โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.1 คำนวณปริมาณ Quant-iT™ Working Solution ซึ่งต้องได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 µl ต่อ 1 sample

3.2 ขั้นตอนการทำ Quant-iT™ Working Solution

ผสม Quant-iT™ reagent ปริมาณ 1 µl กับ Quant-iT™ buffer ปริมาณ 199 µl จะได้ปริมาณสุดท้ายเท่ากับ 200 µl ต่อ 1 sample เช่น ถ้าต้องการทดสอบ 5 sample จะใช้ reagent ปริมาตร 5 µl และ buffer ปริมาตร 995 รวมปริมาตรทั้งหมด 1,000 µl

3.3 ขั้นตอนเตรียม sample และ standards

(1) เตรียม Standards โดยดูด Working Solution ปริมาณ 190 µl ใส่ thin wall จากนั้นเติม Standards ปริมาณ 10 µl จะได้ปริมาณสุดท้ายเท่ากับ 200 µl

(2) เตรียม sample โดยดูด Working Solution ปริมาณ180-199 µl ใส่ thin wall จากนั้นเติม sample ปริมาณ 1-20 µl จะได้ปริมาณสุดท้ายเท่ากับ 200 µl เช่น ถ้าใช้ sample 5 µl จะใช้ Working Solution ปริมาณ 195 µl ปริมาณสุดท้ายก็จะเท่ากับ 200 µl

3.4 ขั้นตอนการ mix

ทำการ Vortex tube ทั้งหมด เป็นเวลา 2-3 วินาที จากนั้นนำไป spin drown แล้ว Incubate tube ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที

3.5 ขั้นตอนการวัดปริมาณความเข้มข้น DNA โดยใช้เครื่อง Quant - iT™ fluorometer

(1) ทำการ Set ค่า Standards โดยใส่ tube Standards 1 ลงในช่องวัดในเครื่อง ปิดฝา แล้วกดวัด และตามด้วยการวัด Standards 2

(2) วัด tube sample แต่ละ tube เพื่อหาค่าความเข้มข้นของ DNA

4. คำนวนหาปริมาณความเข้มข้นของ DNA ใน sample จากสูตร

ความเข้มข้นของ DNA ใน sample = QF value x (200/x)

โดยที่ X = ปริมาตรของ sample ที่ใส่เข้าไปใน assay tube (หน่วยเป็น microliters)

QF = ค่าที่ปรากฏบนจอแสดงผล

สำหรับหน่วยของปริมาณความเข้มข้นของ DNA ที่วัดได้ ขึ้นอยู่กับชุดทดสอบที่เราใช้วัด ในที่นี้มีหน่วยเป็น ng/mL

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นของ DNA ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งและกลุ่มคนสุขภาพดี จากนั้นนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

(1) หาค่ากลางของข้อมูลโดยใช้ค่ามัธยฐาน (Median)

(2) วิเคราะห์ค่าความแตกต่างของปริมาณความเข้มข้นของ DNA ในพลาสมาของผู้ป่วยโรคมะเร็งและกลุ่มคนสุขภาพดีโดยใช้ Mann-Whitney Test

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติกำหนดให้มีความเชื่อมั่นของการวิเคราะห์ร้อยละ 95

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การวิเคราะห์เปรียบเทียบค่า DNA ในพลาสมา

3.1.1 ระหว่างกลุ่มคนสุขภาพดี และ กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

จากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 200 ราย ปริมาณความเข้มข้นของ DNA ในพลาสมาของกลุ่มคนที่มีสุขภาพดี (healthy controls) จำนวน 100 ราย มีค่ามัธยฐาน(ค่าพิสัยระหว่างควอไทม์: IQR) เท่ากับ 0.5 (0.5 – 26.75) ng/ml ส่วนผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทั้งหมด 100 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเต้านมแล้วจำนวน 65 ราย พบค่าค่ามัธยฐาน(ค่าพิสัยระหว่างควอไทม์: IQR) เท่ากับ 0.5 (0.5 – 0.5) ng/ml และผู้ป่วยมะเร็งที่ยังไม่ได้ผ่าตัดเต้านมจำนวน 35 ราย มีค่ามัธยฐานเท่ากับ 412 (180–1,160) ng/ml ค่ามัธยฐานของกลุ่มผู้มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P-value = <0.001*) ส่วนค่ามัธยฐานของผู้ป่วยที่มีขนาดก้อนมะเร็งน้อยมะเร็งกว่า 2 เซนติเมตร เท่ากับ 130 (0.5–218) ng/ml และค่ามัธยฐานของผู้ป่วยที่มีขนาดก้อนมะเร็งมากกว่า 2 เซนติเมตร เท่ากับ 782.5 (220–1,270) ng/ml มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P-value = 0.001*)

ปริมาณความเข้มข้นของ plasma DNA แบ่งตามภาวะทางคลินิกด้วยค่ามัธยฐาน(IQR) ดังนี้ ผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี มีค่ามัธยฐาน(IQR) เท่ากับ 268 (180–1,160) ng/ml ผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 50 ปีเท่ากับ 634.5 (208.5–1,250) ng/ml ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านมข้างขวา เท่ากับ 303.5 (145–1,025) ng/ml ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านมข้างซ้าย เท่ากับ 929.0 (226–1,435) ng/ml ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีขนาดของมะเร็งน้อยกว่า 2 เซนติเมตร เท่ากับ 130 (0.5–218) ng/ml ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีขนาดของมะเร็งมากกว่า 2 เซนติเมตร เท่ากับ 782.5 (220–1,270) ng/ml ผู้ป่วยที่มีภาวะการกระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ เท่ากับ 634.5 (272.25–1,107.5) ng/ml ผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะการกระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ เท่ากับ 202 (110–1,340) ng/ml ผู้ป่วยที่มีภาวะ metastasis เท่ากับ 1,145 (729.5–1,805) ng/ml ผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะ metastasis เท่ากับ 339 (150 –1,120) ng/ml โดยค่าความเข้มข้นของ DNA ของกลุ่มตัวอย่างแบ่งตามภาวะทางคลินิกแสดงผลดังตาราง 1

ตาราง 1 ความเข้มข้นของ plasma DNA แบ่งตามภาวะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

Clinical pathology	n	Median (ng/ml)	IQR (ng/ml)	*P-value*
Healthy controls	100	0.5	0.5 – 26.75	*< 0.001*
Breast cancer patients	35	412	180 – 1,160	
Age (years)				*0.216*
< 50	17	268	130 – 1,040	
≥ 50	18	634.5	208.5 – 1,250	
Position				*0.172*
Right	22	303.5	145 – 1,025	
Left	13	929.0	226 – 1,435	
Size (c.m.)				*0.001*
≤ 2.0	7	130	0.5 – 218	
> 2.0	28	782.5	220 – 1,270	
Spread to Axillary				*0.121*
Yes	20	634.5	272.25 – 1,107.5	
No	15	202	110 – 1,340	
Metastasis				*0.058*
Yes	4	1,145	729.5 – 1,805	
No	31	339	150 – 1,120	

IQR= Interquartile Range

ผลการศึกษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 100 คน พบว่าผู้ป่วยมะเร็งเต้านม**ระยะที่** 1 มีค่าปริมาณความเข้มข้นของ plasma DNA ที่ค่ามัธยฐาน(IQR) เท่ากับ 0.5 (0.5–218) ng/ml **ระยะที่** 2 มีค่าปริมาณความเข้มข้นของ plasma DNA ที่ค่ามัธยฐาน(IQR) เท่ากับ 268 (130–1,510) ng/ml **ระยะที่** 3 มีค่าปริมาณความเข้มข้นของ plasma DNA ที่ค่ามัธยฐาน(IQR) เท่ากับ 417 (220–1,000) ng/ml **และระยะที่** 4 มีค่าปริมาณความเข้มข้นของ plasma DNA ที่ค่ามัธยฐาน(IQR) เท่ากับ 1,280 (1,010–1,980) ng/ml **ส่วนผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ได้รับการผ่าตัดแล้ว** มีค่าปริมาณความเข้มข้นของ plasma DNA ที่ค่ามัธยฐาน(IQR) เท่ากับ 0.5 (0.5–0.5) ng/ml ดังตาราง 2 **และผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ Plasma DNA ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะต่างๆกับกลุ่มคนสุขภาพดี** พบว่า ค่าปริมาณความเข้มข้นของ plasma DNA **แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่ระยะที่ 2-4 (*P-value* < 0.001) กลุ่มคนสุขภาพดี**

ตาราง 2 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ Plasma DNA ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะต่างๆ

Breast cancer patient	n	Median (ng/ml)	IQR (ng/ml)	*P-value**
Stage I	3	0.5	0.5-218	0.552
Stage II	13	268	130-1,510	<0.001
Stage III	16	417	220-1,000	<0.001
Stage IV	3	1,280	1,010-1,980	0.001
Surgery breast cancer patients	65	0.5	0.5-0.5	

* *P-value* ของเปรียบเทียบกับกลุ่มคนสุขภาพดี

บทที่ 4

บทสรุป และอภิปรายผล

สรุปผลการศึกษา (Discussion and Conclusion)

ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบปริมาณ plasma DNA จากผู้ที่มีสุขภาพดีเทียบกับผู้ที่มีภาวะมะเร็งเต้านม และเปรียบเทียบภาวะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ได้แก่ อายุ ข้างที่เป็นมะเร็งเต้านม ขนาดของมะเร็ง การแพร่ไปสู่ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ และภาวะ metastasis พบว่าผู้ป่วยที่มีภาวะมะเร็งเต้านมมีปริมาณ plasma DNA สูงกว่าคนสุขภาพดี และผู้ป่วยที่มีขนาดก้อนมะเร็งมากกว่า 2 เซนติเมตร มีปริมาณ plasma DNA สูงกว่าผู้ป่วยที่มีขนาดก้อนมะเร็งน้อยกว่า 2 เซนติเมตร การศึกษานี้ใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูปและหาปริมาณ plasma DNA ด้วยเครื่อง Qubit fluorometer ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ง่ายและสามารถทราบผลการวิเคราะห์ได้ภายในเวลา 1 ชั่วโมง จากการศึกษา ของ Xiao Yan Zhong และคณะ พบว่าผู้ป่วยที่มีภาวะ distance metastasis และขนาดของก้อนมะเร็งที่โตขึ้น จะมีค่า plasma DNA ที่เพิ่มขึ้นด้วย จากการศึกษาของ Jose M. Garcia และคณะ พบว่า plasma DNA อาจจะสามารถใช้ในการวินิจฉัยขั้นต้น และอาจทำนายการมีชีวิตรอดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้ จากการศึกษาของ S. A. Leon และคณะ José M. Silva และคณะ Zhao Hui Huang และคณะ พบว่า สามารถใช้ plasma DNA เป็นทางเลือกในการวินิจฉัย ติดตามผลการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้ งานวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้น ผู้วิจัยมีความเห็นว่า การวิเคราะห์ plasma DNA ที่สกัด DNA จาก EDTA blood สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว ผู้ป่วยเจ็บตัวน้อย น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการวิเคราะห์ขั้นต้น และอาจสามารถนำไปสู่การประยุกต์ใช้เพื่อบอกระดับความรุนแรงของมะเร็งเต้านมเพื่อติดตามการรักษาได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ (acknowledgements)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร และขอขอบคุณ ศัลยแพทย์หัวหน้าคลินิกมะเร็งเต้านม หัวหน้ากลุ่มงานศัลยกรรมผู้ป่วยนอก หัวหน้ากลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก นักเทคนิคการแพทย์ประจำหน่วยชีวโมเลกุล โรงพยาบาลพุทธชินราช ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บข้อมูลและผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ทุกท่าน

บรรณานุกรม

1. ธีระวุฒิ คูหะเปรมะ (2551) วารสารโรคมะเร็ง.2,53
2. วิภาภรณ์ ขุนโสภา (2550) มะเร็งคืออะไร.
   Available at: http://www.cccthai.org/ cccweb/Web05/index.htm.
3. ไพรัช เทพมงคล (2528) สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ.
   Available at: http://guru.sanook.com/encyclopedia/
4. อภิชาติ วรรณาวิจิตร (2547) สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ.28 Available at: http://guru.sanook.com/encyclopedia/
5. Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D.,. Fackelmayer, F.O., Hesch, RD., et al. (2001). DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Res*, 61(4), 1659-1665.
6. Gormally, E., Hainaut P., Caboux, E., Airoldi, L., Autrup, H., Malaveille, C., et al. (2004). Amount of DNA in Plasma and Cancer Risk: a prospective study. *Int J Cancer*, 111(5), 746-749
7. Gautschi, O., Bigosch, C., Huegli, B., et al.(2004). Circulating Deoxyribonucleic Acid As Prognostic Marker in Nono-small-cell Lung Cancer Patients Undergoing Chemotherapy. *J Clin Oncol*, 22, 4157-4164
8. Sozzi, G., Conte, D., Leon, M., et al. (2003). Quantification of Free Circulating DNA As Diagnostic Marker in Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21, 3902-3908
9. Silva, J., Sanchez, A., Garcia, J., et al. (2002). Tomor DNA in Plasma at Diagnosis of Breast Cancer Patients Is a Valuable Predictor of Disease-free Survival. *Clinical Cancer Research*, 8, 3761-3766
10. Mueller, S., Holdenrieder, S., Stieber, P., et al. (2006). Early prediction of therapy response in patients with acute myeloid leukemia by nucleosomal DNA fragments. BMC Cancer, 6(143), 1471-2407
11. Attasara, P., Buasom, R., (2008).2007 *Hospital-Based Cancer Registry*.1, 4-6
12. Macdonald, F., Ford, C. and Casson, A. 2004. Molecular biology of cancer: BIOS Scientific Publishers.
13. Attasara, P. and Buasom, R. 2011. Hospital-Based Cancer Registry. Bangkok: National Cancer Institute, Ministry Of Public Health. 3-4.
14. Zhong, X., Ladewig, A., Schmid, S., Wight, E., Hahn, S. and Holzgreve, W. 2007. Elevated level of cell-free plasma DNA is associated with breast cancer. Archives of Gynecology and Obstetrics, 276(4), 327-331.
15. Xue, X., Teare, M. D., Holen, I., Zhu, Y. M. and Woll, P. J. 2009. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. Clinica Chimica Acta, 404(2), 100-104.

16. Futrea, P. A., KASprzyk, A. and Birme, E. 2001. Nature. 409.

17. Papadopoulou, E., Davilas, E., Sotiriou, V., Georgakopoulos, E., Georgakopoulou, S., Koliopanos, A., Aggelakis, F., Dardoufas, K., Agnanti, N. J., Karydas, I. and Nasioulas, G. 2006. Cell-free DNA and RNA in Plasma as a New Molecular Marker for Prostate and Breast Cancer. Annals of the New York Academy of Sciences, 1075(1), 235-243.

18. Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F., Hesch, R. and Knippers, R. 2001. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. Cancer Res, 61, 1659 - 1665.

19. Garcia, J. M., Garcia, V., Silva, J., Peña, C., Dominguez, G., Sanchez, A., Sanfrutos, L., Provencio, M., Millan, I., Chaparro, D., España, P. and Bonilla, F. 2006. Extracellular tumor DNA in plasma and overall survival in breast cancer patients. Genes, Chromosomes and Cancer, 45(7), 692-701.

20. Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. and Yaros, M. J. 1977. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. Cancer Research, 37(3), 646-650.

21. Silva, J., Sánchez, A., Miralles, C., Navarro, F. and Bonilla, F. 2000. Tumor DNA in plasma of breast cancer patients. Relation to treatment. Rev Oncología, 2(3), 141-145.

22. Huang, Z. H., Li, L. H. and Hua, D. 2006. Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. Cancer Letters, 243(1), 64-70.